



## 四肢における形態的特徴の多様性創出に関する研究

著者	関 亮平
号	11
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生博第273号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/58183">http://hdl.handle.net/10097/58183</a>

せき りょうへい

氏名（本籍地）	関 亮平
学 位 の 種 類	博士（生命科学）
学 位 記 番 号	生博第273号
学位授与年月日	平成26年3月26日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研 究 科 ， 専 攻	東北大学大学院生命科学研究科 （博士課程）生命機能科学専攻
論 文 題 目	四肢における形態的特徴の多様性創出に関する研究
博士論文審査委員	（主査） 教 授 田村 宏治 教 授 熊野 岳 助 教 牧野 能士

## 論文内容の要旨

本研究は、形態の多様性創出機構の解明を目的として遂行された。形態の多様化を理解するためには、3つの重要な側面がある。1つは、形態を詳細に評価するとともに種間の違いを把握することである。2つめは、形態の形成過程（多くの場合、胚発生の過程）や、その過程で機能する分子メカニズムを理解することである。種間で多様な形態であっても、基礎となる分子メカニズムが改変されることで生じているはずである。したがって、まずこの基礎を理解しなければならない。3つめは、その分子メカニズムの改変方法、すなわち形態多様化の原動力を明らかにすることである。形態の違いは、タンパク質のアミノ酸配列の違いではなく、遺伝子発現を調節するゲノム配列（シス配列）に起因する場合がほとんどであると考えられている。したがって、形態の違いの要因は最終的にはゲノム上のシス配列の違いに求めることができる。本研究では、これら3つの点それぞれに着目し、鳥類の四肢に見られる形態的特徴を1つのモデルとして解析と議論をおこなった。

## 第1章 鳥類の四肢骨格に見られる形態的特徴

この章では、鳥類の四肢骨格形態の記載を通じて、他の動物種が示す四肢形態との共通性と違いを議論した。四肢骨格の基本形態は四足動物間で保存されており、例えば、基部側から先端部側にかけて柱脚部・軛脚部・自脚部という3つの領域に大別できるという点はどの種においても共通である。そのような共通性を示しながらも、鳥類の四肢にはいくつかの特徴的な骨格形態が見られる。翼（前肢）を形づくる3本の特徴的な指形態や、腓骨が脛骨に比べ細く短いこと、足首の関節が自脚部の領域内に形成されること（軛脚部と自脚部の境界に形成されることが一般的である）などが挙げられる。

一般的な四肢の発生メカニズムに関しては現在までに様々な事実が明らかとなってきたが、上に挙げたような鳥類特異的な骨格形態の形成メカニズムについては不明な点が多い。そこで第1章では、四肢発生の基本的なメカニズムについて記述し、近年明らかになりつつある鳥類特異的な形態形成機構についても言及した。四肢発生の基本的なメカニズムとしては、四肢の原基である肢芽の伸長に必須なAERと、指の個性を決定するはたらきをもつZPAという2つのシグナリングセンターに着目し、その機能と分子メカニズムについて記載した。さらに、肢芽内の領域区画化に重要な役割を果たすHox遺伝子群にも触れ、軛脚部や自脚部に形成される骨格要素との関連を述べた。鳥類特異的な形態形成機構については、Shhシグナルという共通の分子メカニズムを使って翼の3本指の個性が決定される過程を例として取り上げて説明した。

以上のような記載から、四足動物が一般的にもつ共通のメカニズムが改変されることによって鳥類の特異的な四肢骨格形態が生み出されることを議論した。ここで重要となるのは、鳥類の形態やその発生過程だけに注目しては、それが四足動物共通のものなのか鳥類特異的なものなのかは考察

できないということである。すなわち他の動物種との比較解析が重要となる。続く第2章と第3章ではこの点に着目しつつ、異なる視点から形態の多様性創出機構について解析した。

## 第2章 四肢骨格の形態形成における転写因子 *AP-2 $\beta$* の機能

形態の多様性を生み出すメカニズムを理解するためには、まず基本となるメカニズムを把握する必要がある。そこで第2章では、四肢の中でも指の骨格に着目し、その形態形成を担う分子メカニズムを明らかにすることを目的として解析をおこなった。ヒトの Char syndrome という遺伝病の症状から、指骨格の形態形成に重要な役割を果たすことが予想された *AP-2 $\beta$*  という転写因子に焦点を当て、この遺伝子が担う機能を解析した。また、発現状態の種間差と指形態の種間差にも注目し、この遺伝子の機能の仕方の違いが指形態の多様性創出に与える影響を考察した。

まず、*AP-2 $\beta$*  が直接的に四肢発生に関与するかどうかが不明であったため、この点について検証した。Char syndrome の原因となる *AP-2 $\beta$*  コード領域内の点突然変異と同等の変異を施した、ドミナントネガティブ型 *AP-2 $\beta$*  をニワトリの後肢芽に導入し、指形態に与える影響を調査した。その結果、骨格の短縮や、関節の形成不全、指の本数の減少など、様々な骨格形成不全が指を含む自脚部の骨格内で観察された。したがって、*AP-2 $\beta$*  が四肢発生の中でも特に自脚部の骨格形成に必須であることが示された。

次に、*AP-2 $\beta$*  の発現解析をニワトリの前肢および後肢、マウスの前肢、ヤモリの前肢においておこなった。その結果、いずれの肢芽においても *AP-2 $\beta$*  は肢芽の先端部に発現していることが明らかになった。特に注目すべきは指ごとに発現様式が異なっていることであり、*AP-2 $\beta$*  を長時間発現し続けた領域からは長い指が形成される、という相関関係が見出された。以上の結果から、*AP-2 $\beta$*  が指の伸長に何らかの機能を果たすことが予想されたため、指の長さの制御に中心的な役割を果たすことがすでに知られている AER との関連について調査した。AER のマーカー遺伝子 *Fgf8* の発現と照らし合わせると、*AP-2 $\beta$*  は AER の直下の間充織で発現することが示された。次に AER と *AP-2 $\beta$*  発現の間の因果関係を明らかにするため、AER を切除した際の *AP-2 $\beta$*  の発現変化を調べた。すると、*AP-2 $\beta$*  の発現は AER 切除により完全に消失し、その消失は AER から分泌される FGF8 タンパク質を添加することでレスキューできた。その他の解析から *Shh* が *AP-2 $\beta$*  の発現の開始に寄与することが示唆されたが、発現の維持には AER からの Fgf シグナルが必要であることが示された。以上の結果より、*AP-2 $\beta$*  が指の伸長に十分であることと予想されたため、*AP-2 $\beta$*  の機能亢進実験を次におこなった。しかしながら、指が過剰に伸長するという結果は得られなかった。この結果から、指の伸長には *AP-2 $\beta$*  以外の因子も必要となることが考えられる。

本研究から、指の形態形成を直接制御しうる転写因子として *AP-2 $\beta$*  が特定された。また、*AP-2 $\beta$*  の発現時間の長さと形成される指の長さの間には明確な相関関係が見られたという結果から、この遺伝子の発現差が指の長さの多様性形成に関与することが考えられる。可能性の1つとして、*AP-2 $\beta$*  の発現量や発現時間の変更が指の形態形成の分子メカニズムに影響を与え、その結果指の長さの多様性がもたられることが考えられる。このような発現の調節はゲノム上のシス配列によるものと予想される。

### 第3章 鳥類の形態的特徴を生み出すゲノム配列の探索

上の解析結果は、種間で同じ遺伝子セットを使いながらもその使い方の違いが形態多様性を生み出す、ということを示した1つの例である。そこで、第3章では遺伝子発現の制御に着目し、それを担うシス配列（特にエンハンサー）の活性の違いにより形態差が生み出される可能性に迫った。本研究では、鳥類が示す互いに類似した四肢形態の形成に、鳥類のみに高度に保存されたゲノム配列（highly conserved element; HCE）が関与することを予想し、解析をおこなった。

鳥類のみに存在する HCE を特定するため、鳥類 48 種の全ゲノム配列の比較をおこなうとともに、他の脊椎動物のゲノム配列との比較もおこなうことで脊椎動物全体に存在する HCE を除外した。その結果、鳥類特異的 HCE のほぼ全てが遺伝子間領域かイントロンというエンハンサーとしての機能を担う領域に存在することが判明した。鳥類特異的 HCE がコーディング配列内にほとんど存在しなかったことは、鳥類とその他の動物種の違いが、タンパク質のアミノ酸配列ではなく、遺伝子発現の調節配列の違いに起因していることを強く示唆している。これらの鳥類特異的 HCE の中から特に保存度の高いもの、かつ配列長の長いものを選択し、その直近の遺伝子を「鳥類特異的 HCE のはたらきにより鳥類特異的発現を示しうる遺伝子」として 100 個選抜した。

この 100 遺伝子の中から肢芽において鳥類特異的発現を示すものをスクリーニングするために、ニワトリ・マウス・ヤモリの胚を使った遺伝子発現解析をおこない、発現領域を比較した。その結果、鳥類特異的発現を示す遺伝子を 6 つ特定した。中でも、空を飛ぶために必要な風切り羽の形成位置に特異的に発現する *Sim1* という遺伝子が特に興味深いものであった。より詳細な発現解析の結果、*Sim1* が風切り羽の形成位置決定に関与する可能性が示された。

今回特定された鳥類特異的発現を示す 6 遺伝子のほとんどは、肢芽における機能解析がおこなわれていたため、鳥類特異的な四肢形態との因果関係は見出せていない。しかし、本研究により、鳥類特異的 HCE の制御下で鳥類特異的発現を示す候補遺伝子を特定する、という段階までは達成された。今後は、鳥類特異的 HCE が確かにエンハンサーとして標的遺伝子の転写を活性化するかを調査するとともに、個々の標的遺伝子の機能を理解することが、「鳥類特異的ゲノム配列」、「鳥類特異的遺伝

子発現」、「鳥類特異的形態」の三者を一直線で結ぶために必要となるだろう。

本研究全体を通じて、はじめに述べた形態多様化の基本原理が具体的にどのように機能するのかということに関して、その一例を鳥類の四肢形態に見出すことができたと考えている。

本研究は、形態の多様性創出機構の解明を目的とし、3つの側面から研究が行われた。1つめは、形態を詳細に評価するとともに形態の種間差を把握すること、2つめは形態の形成過程やその過程で機能する分子メカニズムを理解すること、そして3つめは、そのような形態形成分子メカニズムの改変方法、すなわち形態多様化の原動力を明らかにすることである。本研究は、これら3つの着眼点を元に、鳥類の四肢に見られる形態的特徴を1つのモデルとして解析と議論をおこなっている。したがって本論文も3つの章によって構成されている。

第1章（鳥類の四肢骨格に見られる形態的特徴）では、鳥類の四肢骨格形態の記載を通じて、他の動物種が示す四肢形態との共通性と違いを議論している。とくに、四足動物が一般的にもつ共通のメカニズムが改変されることによって鳥類の特異的な四肢骨格形態が生み出されることを議論している。このような議論は全く新規の内容である。

第2章（四肢骨格の形態形成における転写因子 *AP-2 $\beta$*  の機能）では、ヒトの Char syndrome という遺伝病の原因遺伝子として同定された *AP-2 $\beta$*  という転写因子に焦点を当て、この遺伝子が担う機能を解析している。また、本遺伝子の発現状態の種間差と指形態の種間差にも注目し、この遺伝子の機能の仕方の違いが指形態の多様性創出に与える影響を考察した。本研究から、指の形態形成を直接制御しうる転写因子として *AP-2 $\beta$*  が特定された。

第3章（鳥類の形態的特徴を生み出すゲノム配列の探索）では遺伝子発現の制御に着目し、鳥類が示す互いに類似した四肢形態の形成に、鳥類のみに高度に保存されたゲノム配列が関与することを予想し、種々の解析により特異的形態を担うシス配列（特にエンハンサー）の活性の違いにより形態差が生み出される可能性を見出している。

本研究全体を通じて、形態多様化の基本原理が具体的にどのように機能するのかという点に関して、その一例を鳥類の四肢形態に見出すことができている。このような新規概念を提唱しただけでなく、新規指形成因子の発見など本研究成果は当該研究分野に対してさまざまな重要な貢献をもたらした。これらの研究成果は本人が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を会得していることを明確に示しており、関亮平提出の論文を博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。